

# T/GDFDTAEC 标准编制说明

## 《蜂胶类产品中总黄酮的测定》

### 一. 工作简况

#### (一)、任务来源

2020年5月,广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)、无限极(中国)有限公司、向广东省食品药品评审认证技术协会提出了制定广东省食品药品评审认证技术协会团体标准《蜂胶类产品中总黄酮的测定》的项目申请,协会组织评审专家小组,于2020年6月5日召开团体标准立项评审会议,评审小组成员对该项目进行论证并获得通过,同时开始该标准的研究制定工作,在组织上拟定了相关的措施,确定了本部标准的修订思路。

2020年7月,广东省食品药品评审认证技术协会下达了该项目的制定计划任务,详见《关于《植物提取物中二乙烯苯等9种有机残留物含量的测定》等五个团体标准准许立项的通知》(粤食药审评秘[2020]38号)。

#### (二)、主要参加单位

标准起草单位为广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)、无限极(中国)有限公司、汤臣倍健股份有限公司、广东粤微食用菌技术有限公司、华测检测认证集团股份有限公司、广州金至检测技术有限公司、纽斯葆广赛(广东)生物科技股份有限公司、广州汇标检测技术中心、完美(广东)日用品有限公司、绿瘦健康产业集团股份有限公司、东鹏饮料(集团)股份有限公司,由广东省食品药品评审认证技术协会归口。

#### (三)、工作组成员及主要工作过程

1、标准主要起草人:XXXX

2、标准的编制过程

我单位2020年6月组织成立了标准起草小组,确定了工作进度时间表,并进行了分工。

(1)2020年6月-2020年7月,起草小组进行了技术论证和技术规范内容探讨,确定了制定计划、制定原则、标准框架,标准基本内容。

(2)2020年7月-2020年8月,起草小组对蜂胶类保健食品中总黄酮的测定的方法进行调研,收集相关技术资料,对生产企业总黄酮产品类型(蜂胶类保健食品)进行调研汇总。起草小组根据现实需求完成了标准初稿,并对相关企业及技术单位征求意见,对标准初稿意见进行必要的修改。

(3)2020年8月-2020年9月,起草小组完成本方法的研究工作,根据相关参与单位修改意见,完成验证报告。收集相关验证样品,将验证样品分别寄往验证单位,验证单位根据试验报告对标准方法进行验证。

(4)2020年9月-2021年3月,起草小组收集汇总验证单位的标准验证报告,对验证数据进行分析。

### 二. 标准编制原则

制定《蜂胶类产品中总黄酮的测定》遵循以下原则:

#### (一)、规范性

按GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分:标准化文件的结构和起草规则》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分:试验方法标准》的要求进行制定。

#### (二)、一致性

与现行有效的总黄酮含量测定的国家法律、法规、标准规范保持一致,对采用分光光度法测定总黄酮含量的方法提要、分析步骤、结果计算和试验报告等要求作出相应的规定。

#### (三)、适用性

充分考虑全省蜂胶类产品中总黄酮的测定方法现状和现实情况,确定测定方法步骤,适应蜂胶类保健食品中定量总黄酮。

#### （四）、可操作性

充分考虑当前蜂胶类保健食品中总黄酮产品的现状，采用已有的方法、指导原则等对标准进行规范，具有可操作性和普遍性。

#### （五）、先进性

在制定本标准时，参考了现有黄酮分析方法等技术标准、指导原则、团体标准、企业标准等，吸收了国内外几年来先进的分析手段、处理过程、反应条件等，对方法中的处理条件、参数调整、数据准确性等进行优化，体现了标准的技术性、科学性和先进性。

### 三. 标准主要内容的确定及验证

#### （一）标准主要内容确定

本标准内容主要 8 个部分：范围、规范性引用文件、术语与定义、方法原理、仪器与试剂、分析步骤、分析结果表述、精密度。

##### 1、范围

本标准规定了蜂胶类保健食品总黄酮的测定方法，本方法适用于蜂胶类保健食品中总黄酮含量的测定。

##### 2、规范性引用文件

列出了标准条文制定过程中引用的标准。

##### 3、术语与定义

本标准没有需要界定的术语和定义。

##### 4、方法原理

对方法测定引用的原理依据进行了说明。

##### 5、仪器与试剂

5.1 明确了方法所使用试剂名称及级别。

5.1.1 对于对照品的选择上，采用芦丁作为本标准的对照品

5.1.1.1 用建立的检测方法测定，采用 7 个梯度的对照液浓度（芦丁含量分别为 0, 47, 94, 189, 284, 378, 472 $\mu\text{g}$ ），进行光谱扫描（见图 1）。

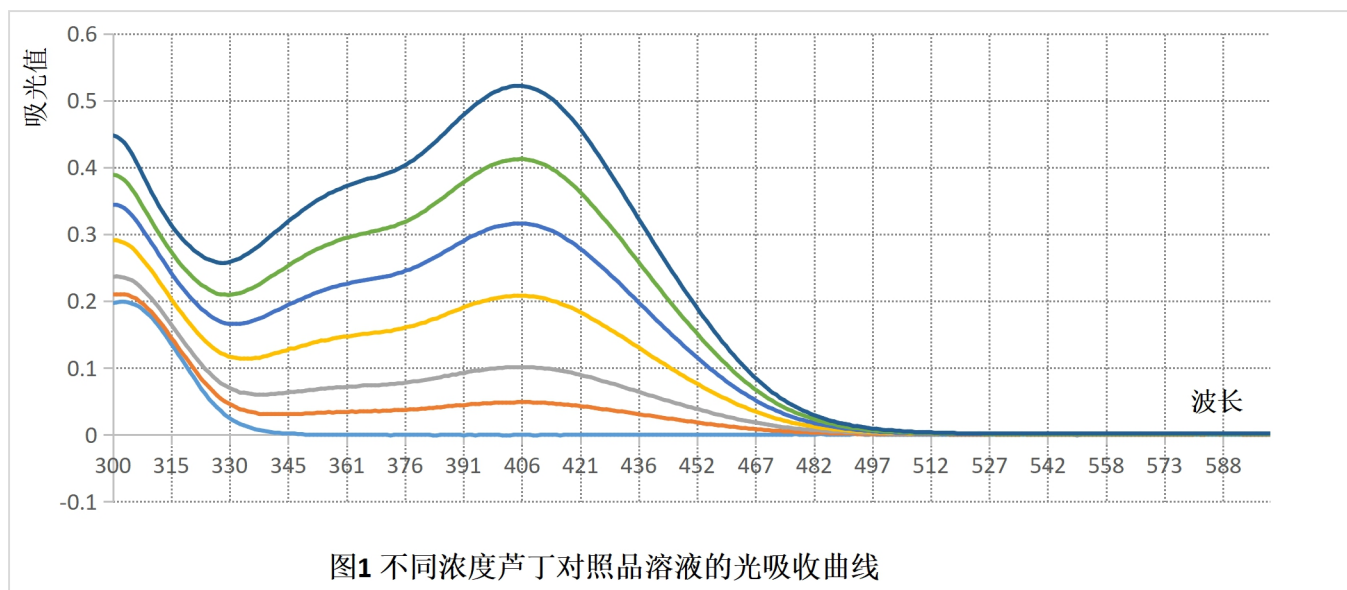


图1 不同浓度芦丁对照品溶液的光吸收曲线

由图看出，7 个不同浓度芦丁对照液在波长 406nm 处有最大吸收峰。因此，建立的检测方法的测定波长选为 406nm。

5.1.1.2 用建立的检测方法测定，制定工作曲线，结果见表 1。以质量 c 为横坐标，吸光度值 A 为纵坐标，进行线性拟合。

表 1 芦丁标准溶液的线性回归方程和线性相关系数

| 编号 | 质量 c (ug) | 吸光度值 A |
|----|-----------|--------|
| 1  | 0         | 0.002  |
| 2  | 47.3      | 0.051  |
| 3  | 94.5      | 0.109  |
| 4  | 189.0     | 0.214  |
| 5  | 283.5     | 0.327  |
| 6  | 378.0     | 0.430  |
| 7  | 472.5     | 0.536  |

芦丁线性方程和相关系数  $y = 0.0011x + 0.0006$   $R^2 = 0.9999$

由表 1 线性方程和相关系数得出，芦丁标准工作曲线在（建立的检测方法）0~500ug 质量范围间线性关系良好。

5.1.2 对于聚酰胺粉的选择上，选择国药集团沪试:100-200 目作为本标准总黄酮吸附剂。

准确称取黄酮样品 0.5g，按方法操作，改变聚酰胺粉（目数：厂家）后，测定其含量。结果见表 2。

表 2 聚酰胺粉的选择

| 编号 | 聚酰胺粉(厂家;目数)    | 测得含量(g/100g) | 平均含量(g/100g) |
|----|----------------|--------------|--------------|
| 1  | 麦克林;60-80 目    | 3.18         | 3.09         |
| 2  | 麦克林;60-80 目    | 2.99         |              |
| 3  | 国药;80-100 目    | 3.79         | 3.91         |
| 4  | 国药;80-100 目    | 4.02         |              |
| 5  | 国药;100-200 目   | 4.13         | 4.11         |
| 6  | 国药;100-200 目   | 4.09         |              |
| 7  | 阿拉丁;100-200 目  | 3.22         | 3.33         |
| 8  | 阿拉丁;100-200 目  | 3.43         |              |
| 9  | 九鼎化学;100-200 目 | 3.31         | 3.33         |

通过对不同厂家不同目数的比较,由表 2 中数据得知,测得含量最高为国药的 100-200 目数的聚酰胺粉。通过观察,在购买的这批聚酰胺粉中,可能原因是国药 100-200 目数的聚酰胺粉相比实验中的其他厂家的颗粒细,相对均匀,填柱后松紧度和解吸效果较好。因而选择国药的 100-200 目数的聚酰胺粉作为总黄酮的吸附产品。

## 5.2 仪器设备

标准中涉及仪器设备均为分析实验中仪器,其中,分析天平精密密度要求达到 0.0001g,超声提取器超声功率要求为 $\geq 200W$ 。

## 6、分析步骤

6.1 对于黄酮显色反应中几种试剂的加入量及试验条件进行了选择分析。

### 6.1.1 硝酸铝溶液用量的比较

分别取对照品使用溶液 0.50mL 于 12 个比色管中,再分别加入 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 和 1.50mL 硝酸铝溶液和 0.50mL 乙酸-乙酸钠溶液,摇匀,用 70%乙醇定容至刻度,摇匀静待显色反应,30min 后再用 1cm 石英比色皿,参比试剂空白,用紫外可见分光光度计在 406 nm 处测其吸光度值 A。分析硝酸铝溶液最佳用量。

表 3 方法耐用性试验 (硝酸铝溶液用量)

| 编号 | 硝酸铝用量 mL | 吸光度值 A | 平均值   |
|----|----------|--------|-------|
| 1  | 0.25     | 0.119  | 0.117 |
| 2  | 0.25     | 0.115  |       |
| 3  | 0.50     | 0.120  | 0.120 |
| 4  | 0.50     | 0.120  |       |
| 5  | 0.75     | 0.109  | 0.111 |
| 6  | 0.75     | 0.113  |       |
| 7  | 1.00     | 0.108  | 0.108 |
| 8  | 1.00     | 0.108  |       |
| 9  | 1.25     | 0.102  | 0.105 |
| 10 | 1.25     | 0.108  |       |
| 11 | 1.50     | 0.097  | 0.099 |
| 12 | 1.50     | 0.100  |       |

由表 3 可知,硝酸铝用量在 0.25~0.50mL 间吸光度值相对稳定且在 0.50mL 最高;在 0.50~1.50mL 之间呈现缓慢下降趋势,为了三价铝离子和总黄酮能够络合完全和吸光值的稳定,硝酸铝用量以 0.5mL 为宜。

### 6.1.2 乙酸-乙酸钠溶液 PH 值的比较

分别取对照品使用溶液 2.50mL 于 14 个比色管中,再分别加入 0.50mL 硝酸铝溶液和 pH 值为 4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8 和 6.0 的乙酸-乙酸钠溶液各 0.50mL,摇匀,用 70%乙醇定容至刻度,摇匀静待显色反应,30min 后再用 1cm 石英比色皿,参比试剂空白,用紫外可见分光光度计在 406nm 处测其吸光度值 A。分析最佳乙酸-乙酸钠溶液 PH 值。

表 4 方法耐用性试验 (乙酸-乙酸钠溶液 PH 值)

| 编号 | 乙酸-乙酸钠 PH 值 | 吸光度值 A | 平均值   |
|----|-------------|--------|-------|
| 1  | 4.8         | 0.495  | 0.498 |
| 2  | 4.8         | 0.501  |       |
| 3  | 5.0         | 0.530  | 0.529 |
| 4  | 5.0         | 0.528  |       |
| 5  | 5.2         | 0.522  | 0.523 |
| 6  | 5.2         | 0.524  |       |
| 7  | 5.4         | 0.529  | 0.528 |
| 8  | 5.4         | 0.527  |       |
| 9  | 5.6         | 0.533  | 0.533 |
| 10 | 5.6         | 0.533  |       |
| 11 | 5.8         | 0.532  | 0.532 |
| 12 | 5.8         | 0.532  |       |
| 13 | 6.0         | 0.524  | 0.524 |
| 14 | 6.0         | 0.525  |       |

由表 4 可知,在 pH5.0~6.0 间,吸光度值相对稳定,RSD 为 0.77%;在 pH5.0 到 4.8 之间,吸光度值是降低的,可能原因是酸性较大会破坏络合物的结构。兼顾络合物对环境酸碱度的适用性,反应的灵敏性和吸光度值的稳定性,选取了 pH 稳定范围中间值 5.6,则乙酸-乙酸钠 pH=5.6。

### 6.1.3 显色反应时间的比较

取配制好的对照品使用溶液 1.0mL 于比色管中,加入 0.50mL 硝酸铝溶液和 0.50mL 乙酸-乙酸钠溶液,摇匀,用 70%乙醇定容至刻度,摇晃混匀,反应显色,立即用 1cm 石英比色皿,参比试剂空白,在 406nm 波长中每隔 10min 测定其吸光度值。分析最佳显色反应时间。

表 5 方法耐用性试验（显色反应时间）

| 编号 | 显色反应时间 | 吸光度值吸光度值 A |
|----|--------|------------|
| 1  | 0      | 0.146      |
| 2  | 10     | 0.211      |
| 3  | 20     | 0.211      |
| 4  | 30     | 0.210      |
| 5  | 40     | 0.210      |
| 6  | 50     | 0.211      |
| 7  | 60     | 0.212      |
| 8  | 70     | 0.212      |
| 9  | 80     | 0.212      |
| 10 | 90     | 0.213      |
| 11 | 100    | 0.213      |
| 12 | 110    | 0.214      |
| 13 | 120    | 0.215      |

由表 5 可知，处于 10min~120min 范围内，吸光度值处于稳定状态，说明已显色完全。为了维持检测反应的稳定性和灵敏性，选取 30min 为显色反应时间。

6.2 对于黄酮提取过程，标准对试样提取过程进行了分别描述处理。

6.2.1 乙醇提取浓度的比较

准确称取黄酮样品 0.5g，按方法操作，改变提取乙醇的浓度为 25%、50%、75%、95%、100%后，比较提取效果。分析最佳乙醇提取浓度。

表 6 方法耐用性试验（乙醇提取浓度）

| 编号 | 乙醇提取浓度% | 测得含量(g/100g) | 平均含量(g/100g) |
|----|---------|--------------|--------------|
| 1  | 25      | 2.76         | 2.74         |
| 2  | 25      | 2.71         |              |
| 3  | 50      | 3.84         | 3.94         |
| 4  | 50      | 4.05         |              |
| 5  | 75      | 4.19         | 4.24         |
| 6  | 75      | 4.28         |              |
| 7  | 95      | 4.13         | 4.16         |
| 8  | 95      | 4.20         |              |

|    |     |      |      |
|----|-----|------|------|
| 9  | 100 | 3.99 | 4.05 |
| 10 | 100 | 4.11 |      |

观察表 6, 当乙醇浓度达到 75%及以上时, 总黄酮含量基本相差不大, RSD 为 3.5%, 因此总黄酮提取溶液浓度首选 75%, 若遇到样品在溶剂中不易分散的, 可增大乙醇浓度。

### 6.2.2 超声提取时间的比较

准确称取黄酮样品 0.5g, 按方法操作, 改变超声提取时间为 20min、30min、40min、50min、60min、90min 后, 测定其含量。分析最佳超声提取时间。

**表 7 方法耐用性试验 (超声提取时间)**

| 编号 | 超声提取时间 min | 测得含量(g/100g) | 平均含量(g/100g) |
|----|------------|--------------|--------------|
| 1  | 20         | 3.81         | 3.74         |
| 2  | 20         | 3.67         |              |
| 3  | 30         | 4.09         | 4.15         |
| 4  | 30         | 4.20         |              |
| 5  | 40         | 4.06         | 4.04         |
| 6  | 40         | 4.02         |              |
| 7  | 50         | 3.97         | 4.07         |
| 8  | 50         | 4.16         |              |
| 9  | 60         | 3.99         | 3.98         |
| 10 | 60         | 3.97         |              |
| 11 | 90         | 3.97         | 3.94         |
| 12 | 90         | 3.92         |              |

由表 7 可知, 超声时间在 30min~90min 间测定总黄酮含量基本一致, RSD 为 4.0%, 说明在这段时间已提取完全, 由于要维持检测反应的稳定性以及不浪费过多时间, 选取 30min 为总黄酮提取时间。

### 6.3 标准方法重复性分析

用建立的方法对同一批次的黄酮样品进行六次测定。计算六个测定结果的相对标准偏差(RSD), 分析重复性。

**表 8 测定方法的重复性**

| 测试序号 | 测得含量(g/100g) | 平均含量(g/100g) | 相对标准偏差(RSD/%) |
|------|--------------|--------------|---------------|
| 1    | 4.19         | 4.16         | 1.8           |
| 2    | 4.28         |              |               |
| 3    | 4.09         |              |               |
| 4    | 4.20         |              |               |
| 5    | 4.13         |              |               |

由表 8 可知, 用建立的方法进行六次测定的 RSD 为 1.8%, 符合含量测定要求, 重复性良好。

#### 6.4 标准方法精密度分析

用建立的方法对同一批次的黄酮样品进行六次测定, 其中样品取样量为 0.5g, 分别在不同日期, 不同人员, 不同仪器的情况下分别测试两次, 计算六个测定结果的相对标准偏差 (RSD), 分析结果见表 9。

表 9 测定方法的中间精密度

| 测试序号 | 测得含量 (g/100g) | 平均含量 (g/100g) | 相对标准偏差 (RSD/%) |
|------|---------------|---------------|----------------|
| 日期 1 | 4.14          |               |                |
| 日期 2 | 3.94          |               |                |
| 人员 1 | 4.02          | 4.12          | 3.1            |
| 人员 2 | 4.08          |               |                |
| 仪器 1 | 4.24          |               |                |
| 仪器 2 | 4.27          |               |                |

由表 9 可知, 用建立的方法进行六次测定的 RSD 为 3.1%, 符合含量测定要求, 精密度良好。

#### 6.5 标准方法准确度分析

称取黄酮样品 0.5g (精确到 0.0001g), 共称取 12 个, 每四个为一组一共三组, 每组保留一个不加标, 另外三个进行加标回收实验。样品称取后, 按试验方法操作, 于样品中分别加入不同量芦丁对照品 (92.6%), 按试验方法处理进行比色测定, 即进行三组不同浓度的加标回收实验, 分析结果见表 10。

表 10 回收率实验结果

| 序号 | 称样量 g  | 实际称标 (芦丁含量 92.6%) 量 (mg) | 换算加标 (芦丁含量 100%) 量 (mg) | 测得量 (g/100g) | 测得量 (mg) | 加标回收率 (%) | 平均回收率 (%) |
|----|--------|--------------------------|-------------------------|--------------|----------|-----------|-----------|
| 1  | 0.5205 | 0                        | 0                       | 4.28         | —        | —         |           |
| 2  | 0.5033 | 11.39                    | 10.55                   | 6.13         | 30.85    | 88.3      | 85.7      |
| 3  | 0.5182 | 11.58                    | 10.72                   | 6.06         | 31.40    | 86.0      |           |
| 4  | 0.5366 | 12.02                    | 11.13                   | 5.99         | 32.14    | 82.7      |           |
| 5  | 0.5009 | 0                        | 0.0                     | 4.20         | —        | —         |           |
| 6  | 0.5211 | 21.85                    | 20.23                   | 7.65         | 39.86    | 88.8      | 88.4      |
| 7  | 0.5139 | 22.69                    | 21.01                   | 7.88         | 40.50    | 90.0      |           |
| 8  | 0.5482 | 22.41                    | 20.75                   | 7.47         | 40.95    | 86.3      |           |
| 9  | 0.5185 | 0                        | 0.0                     | 3.97         | —        | —         |           |
| 10 | 0.5149 | 33.63                    | 31.14                   | 9.36         | 48.19    | 89.1      | 89.7      |
| 11 | 0.5221 | 32.14                    | 29.76                   | 9.00         | 46.99    | 88.2      |           |
| 12 | 0.5004 | 33.37                    | 30.90                   | 9.64         | 48.24    | 91.7      |           |



由表 10 可知，用建立的方法进行回收率测定，结果都在 80%以上，符合含量测定要求，准确率良好。

## 6.6 标准方法专属性分析

标号 1 至 10，以 1, 2 号作为空白试剂管，称取 0.5g 试剂空白；以 3, 4 号作为 1 号阴性样试验管，称取(具有同等抗氧化性功能)抗坏血酸 1.0g；以 5, 6 号作为 2 号阴性样试验管，称取(具有同等抗氧化性功能)没食子酸 1.0g；以 7, 8 号作为阳性样试验管，称取黄酮样品 0.5g；以 9, 10 号作为阳性样加标试样管，称取黄酮样品 0.5g 和 10mg 标准对照品 (92.6%)。分别将 1~10 号按方法进行处理，在 406nm 处测定吸光度值 A。分析结果见表 11。

表 11 方法专属性试验

| 编号 | 专属性试验条件 | 吸光度值 A | 平均值    |
|----|---------|--------|--------|
| 1  | 空白试剂    | 0.010  | 0.009  |
| 2  | 空白试剂    | 0.008  |        |
| 3  | 1 号阴性样  | -0.048 | -0.040 |
| 4  | 1 号阴性样  | -0.032 |        |
| 5  | 2 号阴性样  | 0.026  | 0.023  |
| 6  | 2 号阴性样  | 0.020  |        |
| 7  | 阳性样     | 0.203  | 0.198  |
| 8  | 阳性样     | 0.192  |        |
| 9  | 阳性样加标   | 0.281  | 0.284  |
| 10 | 阳性样加标   | 0.286  |        |

由表 11 测定后结果可看出，空白试剂和阴性样的吸光值都是极低的，而含有目标物质（阳性样和阳性加标样）吸光值也能达到预期，说明建立的方法对目标物质是有专属性的。

## 7 结论

通过对标准中试验条件、试验内容、试验材料进行分析，对照品的选择性、线性范围、提取方式的确定、耐用性、重复性、精密度、准确度、专属性等性能，确定能满足蜂胶类产品产品中总黄酮的测定。

### （二）参与单位对标准主要内容进行验证

表 12 参与验证单位

| 编号 | 验证单位                |
|----|---------------------|
| 1  | 汤臣倍健股份有限公司          |
| 2  | 广东粤微食用菌技术有限公司       |
| 3  | 华测检测认证集团股份有限公司      |
| 4  | 广州金至检测技术有限公司        |
| 5  | 纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有限公司 |
| 6  | 无限极(中国)有限公司         |
| 7  | 完美（广东）日用品有限公司       |
| 8  | 广州汇标检测技术中心          |
| 9  | 绿瘦健康产业集团股份有限公司      |
| 10 | 东鹏饮料（集团）股份有限公司      |

### 8.1 方法线性范围

验证单位对方法做线性关系，结果如表 13，各验证单位线性相关系数  $r^2 > 0.99$ ，均能满足线性要求。

表 13 验证单位标准曲线及线性关系结果

| 单位名称                | 线性方程                 | 相关系数   | 是否满足线性要求 |
|---------------------|----------------------|--------|----------|
| 汤臣倍健股份有限公司          | $y=0.0011x-0.0039$   | 0.9997 | 是        |
| 广东粤微食用菌技术有限公司       | $y=0.001x-0.0007$    | 0.9997 | 是        |
| 华测检测认证集团股份有限公司      | $y=0.0012x-0.0005$   | 0.9999 | 是        |
| 广州金至检测技术有限公司        | $y=0.00108x+0.0054$  | 0.9996 | 是        |
| 纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有限公司 | $y=0.0011x-0.0038$   | 0.9992 | 是        |
| 无限极(中国)有限公司         | $y=1.2222x-0.007$    | 0.9994 | 是        |
| 完美（广东）日用品有限公司       | $y=0.00114x-0.00012$ | 0.9998 | 是        |
| 广州汇标检测技术中心          | $y=0.0011x+0.0006$   | 0.9999 | 是        |

|                    |                    |        |   |
|--------------------|--------------------|--------|---|
| 绿瘦健康产业集团股份有限<br>公司 | $y=1.0249x-0.0008$ | 0.9999 | 是 |
| 东鹏饮料（集团）股份有限公<br>司 | -                  | -      | - |

## 8.2 方法专属性

验证单位对方法专属性结果如表 14，检测结果可知：空白试剂与阴性样品在 406nm 处吸光度值很小，阳性样品在 406nm 处有明显的吸光度值，阳性样品加标样后，在 406nm 处的吸光值增加，说明选择波长 406nm 有特异性，检测方法的专属性试验符合要求。

表 14 专属性验证结果

| 单位名称                    | 空白试剂  | 1 号阴性样 | 2 号阴性样 | 阳性样   | 阳性样加标 |
|-------------------------|-------|--------|--------|-------|-------|
| 汤臣倍健股份有限公司              | 0.004 | 0.012  | 0.018  | 0.135 | 0.229 |
| 广东粤微食用菌技术有限公司           | 0.000 | 0.000  | 0.000  | 0.050 | 0.094 |
| 华测检测认证集团股份有限公司          | 0.005 | 0.004  | 0.002  | 0.055 | 0.124 |
| 广州金至检测技术有限公司            | -     | -      | -      | -     | -     |
| 纽斯葆广赛（广东）生物科技股份<br>有限公司 | 0.003 | -0.005 | 0.002  | 0.128 | 0.324 |
| 无限极（中国）有限公司             | 0.007 | 0.009  | 0.006  | 0.064 | 0.176 |
| 完美（广东）日用品有限公司           | 0.008 | -0.038 | 0.024  | 0.204 | 0.274 |
| 广州汇标检测技术中心              | 0.003 | 0.001  | 0.001  | 0.092 | 0.217 |
| 绿瘦健康产业集团股份有限公司          | 0.001 | -0.001 | 0.002  | -     | -     |
| 东鹏饮料（集团）股份有限公司          | -     | -      | -      | -     | -     |

## 8.3 方法重复性

验证单位对方法进行 6 平行测试，测试结果见表 15，RSD 均<5%，重复性良好。

表 15 重复性验证结果

| 单位名称           | 测试方式 | 测得含量<br>(g/100g) | 平均含量<br>(g/100g) | 相对标准偏<br>差 (RSD/%) | 是否满足方<br>法要求 |
|----------------|------|------------------|------------------|--------------------|--------------|
| 汤臣倍健股<br>份有限公司 | 1    | 3.43             | 3.36             | 1.7                | 是            |
|                | 2    | 3.34             |                  |                    |              |

|        |   |      |      |     |   |
|--------|---|------|------|-----|---|
|        | 3 | 3.42 |      |     |   |
|        | 4 | 3.34 |      |     |   |
|        | 5 | 3.34 |      |     |   |
|        | 6 | 3.29 |      |     |   |
|        | 1 | 1.20 |      |     |   |
|        | 2 | 1.20 |      |     |   |
| 广东粤微食  | 3 | 1.20 | 1.25 | 4.4 | 是 |
| 用菌技术有  | 4 | 1.30 |      |     |   |
| 限公司    | 5 | 1.30 |      |     |   |
|        | 6 | 1.30 |      |     |   |
|        | 1 | 1.25 |      |     |   |
|        | 2 | 1.26 |      |     |   |
| 华测检测认  | 3 | 1.28 | 1.24 | 1.7 | 是 |
| 证集团股份  | 4 | 1.23 |      |     |   |
| 有限公司   | 5 | 1.23 |      |     |   |
|        | 6 | 1.22 |      |     |   |
|        | - | -    |      |     |   |
|        | - | -    |      |     |   |
| 广州金至检  | - | -    | -    | -   | - |
| 测技术有限  | - | -    |      |     |   |
| 公司     | - | -    |      |     |   |
|        | - | -    |      |     |   |
|        | 1 | 1.52 |      |     |   |
|        | 2 | 1.48 |      |     |   |
| 纽斯葆广赛  | 3 | 1.47 | 1.49 | 1.5 | 是 |
| (广东)生  | 4 | 1.47 |      |     |   |
| 物科技股份  | 5 | 1.48 |      |     |   |
| 有限公司   | 6 | 1.52 |      |     |   |
|        | 1 | 1.56 |      |     |   |
|        | 2 | 1.51 |      |     |   |
| 无限极(中  | 3 | 1.56 | 1.54 | 1.4 | 是 |
| 国)有限公  | 4 | 1.55 |      |     |   |
| 司      | 5 | 1.55 |      |     |   |
|        | 6 | 1.53 |      |     |   |
|        | 1 | 1.14 |      |     |   |
|        | 2 | 1.11 |      |     |   |
| 完美(广东) | 3 | 1.14 | 1.13 | 2.6 | 是 |
| 日用品有限  | 4 | 1.11 |      |     |   |
| 公司     | 5 | 1.11 |      |     |   |
|        | 6 | 1.19 |      |     |   |
| 广州汇标检  | 1 | 1.11 | 1.11 | 2.0 | 是 |
| 测技术中心  | 2 | 1.09 |      |     |   |

|                        |   |      |   |   |   |
|------------------------|---|------|---|---|---|
|                        | 3 | 1.09 |   |   |   |
|                        | 4 | 1.14 |   |   |   |
|                        | 5 | 1.13 |   |   |   |
|                        | 6 | 1.09 |   |   |   |
|                        | - | -    |   |   |   |
|                        | - | -    |   |   |   |
| 绿瘦健康产业集团股份<br>有限公司     | - | -    | - | - | - |
|                        | - | -    |   |   |   |
|                        | - | -    |   |   |   |
| 东鹏饮料<br>(集团)股<br>份有限公司 | - | -    | - | - | - |

#### 8.4 方法精密性

验证单位对方法针对不同时间,不同人员,不同仪器间进行测试,测试结果见表 16, RSD 均<5%,精密性良好。

表 15 精密度验证结果

| 单位名称           | 测试方式 | 测得含量<br>(g/100g) | 平均含量<br>(g/100g) | 相对标准<br>偏差<br>(RSD/%) | 是否满足方<br>法要求 |
|----------------|------|------------------|------------------|-----------------------|--------------|
|                | 日期 1 | 3.45             |                  |                       |              |
|                | 日期 2 | 3.32             |                  |                       |              |
| 汤臣倍健股份有限公司     | 人员 1 | 3.41             | 3.35             | 2.4                   | 是            |
|                | 人员 2 | 3.36             |                  |                       |              |
|                | 仪器 1 | 3.36             |                  |                       |              |
|                | 仪器 2 | 3.23             |                  |                       |              |
|                | 日期 1 | 1.30             |                  |                       |              |
|                | 日期 2 | 1.30             |                  |                       |              |
| 广东粤微食用菌技术有限公司  | 人员 1 | 1.20             | 1.25             | 4.4                   | 是            |
|                | 人员 2 | 1.30             |                  |                       |              |
|                | 仪器 1 | 1.20             |                  |                       |              |
|                | 仪器 2 | 1.20             |                  |                       |              |
|                | 日期 1 | 1.25             |                  |                       |              |
|                | 日期 2 | 1.23             |                  |                       |              |
| 华测检测认证集团股份有限公司 | 人员 1 | 1.25             | 1.23             | 2.6                   | 是            |
|                | 人员 2 | 1.17             |                  |                       |              |
|                | 仪器 1 | 1.23             |                  |                       |              |
|                | 仪器 2 | 1.26             |                  |                       |              |
| 广州金至检测技术有限公司   | -    | -                | -                | -                     | -            |

|                         |               |      |      |     |   |
|-------------------------|---------------|------|------|-----|---|
|                         | -             | -    |      |     |   |
|                         | -             | -    |      |     |   |
|                         | -             | -    |      |     |   |
|                         | -             | -    |      |     |   |
|                         | -             | -    |      |     |   |
| 纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有<br>限公司 | 日期 1          | 1.48 | 1.48 | 1.6 | 是 |
|                         | 日期 2          | 1.51 |      |     |   |
|                         | 人员 1          | 1.46 |      |     |   |
|                         | 人员 2          | 1.50 |      |     |   |
|                         | 仪器 1          | 1.45 |      |     |   |
|                         | 仪器 2          | 1.49 |      |     |   |
|                         | 日期 1          | 1.52 |      |     |   |
|                         | 日期 2          | 1.54 |      |     |   |
| 无限极(中国)有限公司             | 人员 1          | 1.50 | 1.53 | 1.2 | 是 |
|                         | 人员 2          | 1.54 |      |     |   |
|                         | 仪器 1          | 1.55 |      |     |   |
|                         | 仪器 2          | 1.54 |      |     |   |
|                         | 日期 1          | 1.12 |      |     |   |
|                         | 日期 2          | 1.13 |      |     |   |
| 完美（广东）日用品有限公司           | 人员 1          | 1.13 | 1.11 | 2.3 | 是 |
|                         | 人员 2          | 1.07 |      |     |   |
|                         | 日期 1          | 2.38 |      |     |   |
|                         | 日期 2          | 2.42 |      |     |   |
| 广州汇标检测技术中心              | 人员 1          | 2.42 | 2.42 | 0.9 | 是 |
|                         | 人员 2          | 2.41 |      |     |   |
|                         | 仪器 1<br>(116) | 2.43 |      |     |   |
|                         | 仪器 2<br>(785) | 2.44 |      |     |   |
|                         | -             | -    |      |     |   |
| 绿瘦健康产业集团股份有限公司          | -             | -    | -    | -   | - |
|                         | -             | -    |      |     |   |
|                         | -             | -    |      |     |   |
|                         | -             | -    |      |     |   |
|                         | -             | -    |      |     |   |

## 8.5 方法准确度

验证单位对方法进行加标回收，分别添加低、中、高浓度对照品，加入量为所取供试品中待测定成分量 50%（或 80%），100%，120%（或 150%）。测试回收率结果见表 17，加标回收率几乎均为 85%以上。

表 17 准确度验证结果

| 单位名称                | 加标回收率 (%) |         |          |          |          | 平均回收率 (%) | 是否满足方法要求 |
|---------------------|-----------|---------|----------|----------|----------|-----------|----------|
|                     | 加 50%均值   | 加 80%均值 | 加 100%均值 | 加 120%均值 | 加 150%均值 |           |          |
| 汤臣倍健股份有限公司          | 94.1      | —       | 92.7     | —        | 92.4     | 93.0      | 是        |
| 广东粤微食用菌技术有限公司       | 89.8      | —       | 94.9     | —        | 95.4     | 93.3      | 是        |
| 华测检测认证集团股份有限公司      | 84.2      | —       | 93.4     | —        | 82.6     | 86.7      | 是        |
| 广州金至检测技术有限公司        | -         | -       | -        | -        | -        | -         | -        |
| 纽斯葆广赛(广东)生物科技股份有限公司 | 98.5      | —       | 103      | —        | 98.7     | 100       | 是        |
| 无限极(中国)有限公司         | 99.0      | —       | 102      | —        | 98.7     | 100       | 是        |
| 完美(广东)日用品有限公司       | 83.1      | —       | 85.2     | —        | 87.0     | 85.1      | 是        |
| 广州汇标检测技术中心          | 90.1      | —       | 87.8     | —        | 84.7     | 87.5      | 是        |
| 绿瘦健康产业集团股份有限公司      | —         | -       | -        | -        | —        | -         | -        |

## 8.6 方法可靠性

验证单位对派发盲样（蜂胶类保健食品）按标准方法进行测试，结果见表 18，试样测试结果 RSD 均 < 10%。

表 17 盲样验证结果

| 单位名称       | 盲样测试结果 (%) |       |       |       |
|------------|------------|-------|-------|-------|
|            | 硬胶囊 1      | 硬胶囊 2 | 软胶囊 1 | 软胶囊 2 |
| 中国广州分析测试中心 | 3.3        | 1.3   | 2.6   | 4.1   |
| 汤臣倍健股份有限公司 | 3.4        | 1.4   | 2.7   | 4.1   |

|                     |     |     |     |     |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|
| 广东粤微食用菌技术有限公司       | 3.0 | 1.2 | 2.8 | 4.1 |
| 华测检测认证集团股份有限公司      | 3.1 | 1.2 | 2.4 | 3.7 |
| 广州金至检测技术有限公司        | 3.1 | 1.2 | 2.5 | 3.6 |
| 纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有限公司 | 3.7 | 1.5 | 2.6 | 4.2 |
| 无限极（中国）有限公司         | 3.4 | 1.5 | 2.9 | 4.0 |
| 完美（广东）日用品有限公司       | 2.9 | 1.3 | 2.4 | 3.4 |
| 广州汇标检测技术中心          | 3.1 | 1.3 | 2.4 | 3.5 |
| 绿瘦健康产业集团股份有限公司      | 2.9 | 1.2 | 2.4 | 4.1 |
| 平均值 (%)             | 3.2 | 1.3 | 2.6 | 3.9 |
| RSD (%)             | 8   | 9   | 7   | 7   |

## 9 结论

通过方法验证与验证单位数据分析，结果表明：广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）负责修订的《蜂胶类产品中总黄酮的测定》，适用于蜂胶类保健食品中总黄酮含量的测定，本方法操作简单、快速，精密性、重复性、准确度好，适合推荐作为行业团体标准分析方法。

## 四. 与同类标准水平的对比情况标准水平分析

食品中总黄酮的检测方法有多种，有：

（1）高效液相色谱法，在《中国药典（2015版）》银杏叶项下测定总黄酮醇苷就是采用这个方法，此法不仅能检测总黄酮，还能对其中单一成分进行定量分析，但因受仪器和标准物质等条件的限制而难以推广。

（2）直接紫外测定法，原理是：黄酮类化合物有两个紫外吸收区，即 240~280nm 和 300~400nm,选择对照品的最大吸收波长处进行测定（通常测定中选择的波长为 360nm），其优点在于对照品与被测物质具有相同的结构母核，直接测定后，对照品以及供试品的紫外光谱相似度高，两者的最大吸收波长可基本重叠，但此法也有一定的局限性，在 240~280nm 和 300~400nm 下有吸收的其他物质也有很多，出现假阳性的几率相对较高。

（3）三价铝离子显色法则是利用黄酮类化合物与三价铝离子反应，生成有色的金属络合物，在一定浓度范围内符合朗伯比尔定律。此法相对使用最广，比如《DB13/T 385-1998 食品总黄酮测定》、《GB/T 20574-2006 蜂胶中总黄酮含量的测定方法 分光光度比色法》、《NY/T 1295-2007 荞麦及其制品中总黄酮含量的测定》、《SN/T 4592-2016 出口食品中总黄酮的测定》等等均采用此法。

目前国内蜂胶类产品（保健食品）中总黄酮的测定通常方法是三价铝离子（硝酸铝或三氯化铝）显色



法和直接紫外测定法来判定其含量。很多生产企业在自己生产的产品上标示的总黄酮的含量测定来源一般都是根据自己定制的企业标准，或者引用已失效的《保健食品检验与评价技术规范（2003年版）》，或者参考白鸿主编的《保健食品功效成分检测方法》。因原理不一致加上提取条件中各个因素上的区别，导致检测数值有差异，无法体现出产品的真实品质。

现有的总黄酮国家标准也只适用于原始蜂胶和去除了蜂蜡砂石等杂质的精制蜂胶及其蜂胶乙醇溶液（如 GB/T 20574-2006），地方标准曾经出过关于食品总黄酮测定（如 DB13/T 385-1998），这些标准要么只适用于特定的原材料，要么已经废止，推荐本标准分析方法，希望能够填补蜂胶类保健食品标准的空白，及时对行业标准进行有效的补充。

## 五. 与国内相关标准的关系

相对于最新发布行业标准《保健食品理化及卫生指标检验与评价技术指导原则（2020年版）》（以下简称：2020年版指导原则）中总黄酮的测定：

### （1）针对性：

本方法更有针对性，2020年版指导原则对保健食品类别没有细化，适用相对宽泛；本法针对于蜂胶类产品（保健食品）进行验证，适用于对蜂胶类保健品进行黄酮定量，针对性相对较强。

### （2）测定原理：

对于芦丁分光光度测定波长：2020年版指导原则使用的波长是 360nm 和 510nm，本法使用的是 406nm（详见 5.1.1.1）。差别在于方法原理：2020年版指导原则是过柱后直接进行紫外测定（第一法）和碱性环境与三价铝离子进行反应（第二法），而本法是酸性环境与三价铝离子反应，使用芦丁作为对照品，采用本方法进行测定，7个不同浓度芦丁对照液在波长 406nm 处有最大吸收峰，建立的检测方法的测定波长选为 406nm。由于本方法测定原理不同于新发布的两种方法，提出本方法一方面希望能够填补蜂胶类保健食品标准的空白，及时对行业标准进行有效的补充，另一方面也想协助企业，针对其本身蜂胶类保健食品对方法的选择提供更加精准的依据。

### （3）有方法专属性：

空白试剂与阴性样品在 406nm 处吸光度值很小，阳性样品在 406nm 处有明显的吸光度值，阳性样品加标样后，在 406nm 处的吸光值增加，说明选择波长 406nm 有专属性、特异性（详见 6.6 和 8.2）；

### （4）测试方面：

A.对于试样提取条件和试剂反应量等我们也都做过多次验证，对主要影响因素进行了优化及补充，明确了取样量与提取溶液的浓度范围（2020年版指导原则第一法对乙醇溶液的提取浓度没有说明）；

B.我们还对聚酰胺粉的目数进行了研究（2020年版指导原则对聚酰胺粉的目数没有说明），针对蜂胶类保健食品对目数设置为 100-200 目。采用了 5 种市面上销售的聚酰胺粉，根据不同厂家，不同目数进行比较，

选取了相对较佳的产品，一则可以更好地纯化黄酮类物质，二则在使用本标准时，也能够降低不同检测机构由于使用了不同目数及厂家后对黄酮类成分的定量而造成的误差，减免实验室间检测数值的差异性；

C.本标准显色反应过程中扣除了样品空白（2020年版指导原则两个方法没有扣除样品空白），意为避免样品本身杂质带来的干扰，增强本方法的准确性，在九家实验室对标准方法准确度分析验证结果中，回收率结果几乎均为85%以上。

本标准能适用于蜂胶类保健食品中总黄酮含量的测定，推荐作为行业团体标准分析方法，希望能够填补蜂胶类保健食品标准的空白，及时对行业标准进行有效的补充，尽量完善保健食品中总黄酮含量测定的标准应用，在企业针对自身产品中黄酮类成分的定量方法多了一项选择，填补行业标准空缺，提高保健品行业市场的正规性和公正性。

## 六. 重大分歧意见的处理经过和依据

无

## 七. 其他

- 1、本标准不涉及与任何国家法律、法规、规章及强制性标准冲突问题，标准的制定符合国家相关法律、法规、规章的要求。
- 2、本标准不涉及任何专利或知识产权
- 3、建议该标准作为行业团体标准发布实施。
- 4、本标准与目前我省保健品行业科技、生产、工艺及管理水平的适应性强，标准化程度高，便于被该类保健品企业所引用。同时，该方法的确定可以有效的监控我省保健品市场中以总黄酮作为标志性成分的产品，也可作为中小企业生产中质量监控，为我省保健品市场总黄酮含量测定公正性带来可靠性数据，保证我省保健品市场平稳顺利发展。

《蜂胶类产品中总黄酮的测定》标准编制组  
2021年7月

